

51 Int. Cl.³
C 12 P 17.18
(C 12 P 17.18
C 12 R 1.465)

英別記号

庁内整理番号
7258-4B

公開 昭和58年(1983)5月12日

発明の数 1
審査請求 未請求

(全 5 頁)

抗生物質 B-41D、E 及び G の製造法

発明者 三島洋

東京都品川区広町1丁目2番58
号三共株式会社菌研研究所内

特 願 昭56-178061

発明者 寺尾道也

東京都品川区広町1丁目2番58
号三共株式会社菌研研究所内

出 願 昭56(1981)11月6日

発明者 小野道久

東京都品川区広町1丁目2番58
号三共株式会社菌研研究所内

出 願 人 三共株式会社

東京都中央区日本橋本町3丁目
1番地の6

発明者 滝口洋

東京都品川区広町1丁目2番58
号三共株式会社菌研研究所内

代理人 弁理士 櫻出庄治

明 細 書

1 発明の名称

抗生物質 B-41D、E 及び G の製造法

2 特許請求の範囲

1 ストレプトマイセス属に属する抗生物質 B-41 生産菌を培養して B-41D、E 及び G を製造するに際し、ペリン、イソ酪酸、イソ酪基酸、2-ケトイソ酪基酸、イソカプロン酸、これら酸の塩またはエステル、イソブタノール及びそのエステルから選ばれた1種または2種以上を培地に添加することを特徴とする B-41D、E 及び G の製造法。

2 B-41 生産菌がストレプトマイセス属 B-41-146 株である特許請求の範囲第1項記載の製造法。

3 B-41D を製造するための特許請求の範囲第1項記載の製造法。

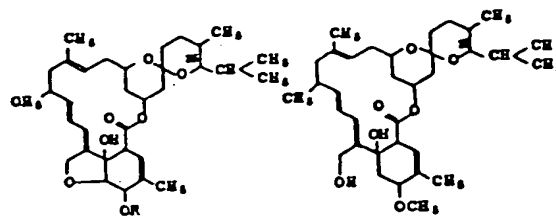
4 ストレプトマイセス属 B-41-146 株を、L-または D-ペリン、イソ酪酸、2-ケトイソ酪基酸およびこれらの酸の塩またはエス

テルから選ばれた1種または2種以上を添加した培地に培養して B-41D を製造する特許請求の範囲第1項記載の製造法。

3 発明の詳細な説明

本発明は駆虫剤及び殺ダニ剤として有用な抗生物質 B-41D、E 及び G を工業的に有利に製造する方法に関する。

B-41D、E 及び G は、ストレプトマイセス属に属する B-41 生産菌、例えば B-41-146 株の培養によつて得られる抗生物質であつて、次の構造式を有し。



B-41D: R=H

B-41E

B-41G: R=CH₃

の数の値またはエヌタル、インプタノール及びそのエヌタルから選ばれた 1 つまたは 2 つ以上を用いて、品質改善することを特徴とする第 41 D。また、上記の製造法である。

B-41 生産菌。例えばストレプトミセス属 B-41-140 株は油蔵省工業技術院微生物工業技術研究所に被工研島寄託第 1438 号として寄託されており、その菌学的性状は特開昭 30-20472 号公報に詳しく記載されている。本発明において使用する菌は、上記 B-41-140 株を内えは工藤菌株、筑外菌株、放射菌株、人工気菌を用いて人工気受したものであつて、B-41 D、E 及び F の生産能を有するものは含まれる。

本発明の方法において地中に添加するペリ
ンはL体又はD体の光学異性体が用いられる。
ペリン、イソ酪酸、イソ古草酸、2-ケトイソ
古草酸、イソカブロン酸のうちではL-または
D-ペリン、イソ酪酸、2-ケトイソ古草酸は
好適に用いられる。これらの酸の塩としてはナ

酵母菌体、コーンステープ・リカー、硫酸アンモニウム、硝酸アンモニウム等が使用される。このほか必要に応じて硫酸カルシウム、食塩、塩化カリ、リン酸塩類を添加することができる。

培養法としては、一般の抗生物質を生産する
方法と同じく液体培養法、とくに試験管培養法が
最も通している。培養は好氣的条件下で行なわ
れ、培養に適当な温度は22~30℃であるが
多くの場合28℃付近で培養する。培地のpH
は概ねpH 5.5~6.5の間でよく、望ましくはpH
の5.5~7.5の中性近傍でよりよい結果をうるこ
とができる。培養はB-41 D、BおよびDの管
酸濃度が最大となる迄行なうが、これに要する
時間は、培養の方法、温度、培地の組成など条
件によつて差はあるものの、通常約5~15日
程度である。

B-41 各成分の検定にあつては次の方法が
用いられる。すなわち、培養物 3 ml を小試験管
にとり、アセトン 7 ml を添加液として抽出し
遠心分離する。ここで得られた上澄の 10 ~ 20

B-41 生産菌の培養に用いられる培地は、該微生物が利用しうる栄養源を含むものならよく、上記添加物を添加するほか、炭素源としてはグルコース、しょ糖、澱粉、グリセリン、水あめ、糖蜜、大豆油などが使用され、窒素源としてはメカムとルタ、大豆粉、小麦胚芽、肉エキス、ペプトン、

上の所定の位置に増せしめ、これをジオキサン：四塩化炭素（10：82）で4時間脱脂後、二重蒸クロマトスキャナを用いて24500の波長（ブランクは34000）で測定し、その収量を標準物質のそれと比較し、算出する。

B-41 D、EおよびOを培養液から採取するにあたっては、他塩基、アルミナ、シリカゲルなどの吸着剤、ダイアイオン HF-10、HP-20（三愛化成社製）などの合成吸着剤、アビセル（旭化成社製）、戸松などの活性炭、イオン交換樹脂、イオン交換樹脂戸通剤などが使用されるが、以下に示す採取方法が最も効果的である。

培養物を、けいそう土などの戸通助剤を用いて戸別し、ここで得られたクーキをメタノール抽出することにより、目的物はメタノール水に溶解してくる。これに水を加えた後、ローヘキサンで抽出し、これを減圧下で濃縮することにより、目的物を含有するオイル状物質が得られ

る。これをシリカゲル（ワコーゲル C-200）のカラムで増せしめ、ローヘキサン：アセトン（55：45）で洗出し、B-41 Dを含有するフラクション、B-41 Eを含有するフラクションおよびB-41 Oを含有するフラクションを調める。各フラクションは減圧下で濃縮し、ここで得られた濃縮物を少量のローヘキサン：酢酸エタール（20：1）に溶解し、望瓶に放置するとB-41 D、B-41 E、B-41 Oがそれぞれ結晶状に得られる。

本発明の方法によれば特にB-41 D、EおよびO成分の生成比率が非常に高く、また生成量も増大するので、分離精製が容易になり工業生産上きわめて有利な方法である。

以下実施例を挙げて、本発明を具体的に説明する。

実施例 1

増地地（シュクロース1g、ポリペプトン0.5g、 K_2HPO_4 0.05g）100ccを500ccエrlenmeyerフラスコに分注し、減圧後、B-

41-146株を1日全耳接種し、48時間28℃で培養し、増地地とした。

この1ccを主増地（グルコース4g、大豆粉1g、スクイミル1g、 $NaCl$ 0.5g、コーンステープ・リカー0.2g及び $CaCO_3$ 0.05g）20cc含む100ccエrlenmeyerフラスコに接種し、28℃で3日間培養したのち、DL-バリン-2- ^{14}C を0.01g/vccになるように添加し、さらに2日間培養した。培養終了時、培養物中に生成したB-41 新抗生物質のうちB-41 Dの占める割合は約0.5g、Eの割合は1.8g及びOの割合は1.5gであつた。なお添加物なしに培養したときD、EおよびOの占める割合は、それぞれ3.7g、0.5gおよび2.5gであつた。

DL-バリン-2- ^{14}C を添加して培養した培養物を戸通し、固体をメタノール抽出した。これに水を加えて5gメタノールに溶解し、ローヘキサンで抽出した。得られたローヘキサン層は蒸留で脱水後、減圧下で濃縮し、オイル状物質を得た。このオイル状物質をシリカゲル

カラムさらにローバーカラム（メルク社製）で精製し、B-41 物質の各成分を単離した。得られた各成分中の ^{14}C の取り込み、400メガヘルツの ^{14}C -NMR及びマス・スペクトルで測定したところ、DL-バリン-2- ^{14}C の ^{14}C がB-41 D、EおよびOのC-25位に特異的に取り込まれている事がわかつた。

実施例 2

実施例1の増地培養物をグルコース1g、アスパラギン0.5g、ロイシン0.5g、リン酸第2カリウム0.05g、硫酸マグネシウム0.05g、食塩0.05g、塩化カルシウム0.02g、硫酸亜鉛0.005g、硫酸マンガン0.001g、硫酸第1鉄0.002g及び微量のビタミン類からなる増地20ccに1ccずつ接種し、DL-バリン、イソ酪酸、2-ケトイソ古草酸、イソカブロン酸及びイソブタノールを第1表に示す条件で添加して、28℃で3日間振とう培養した結果、第1表に示す結果が得られた。

添加物	濃度 (g/Vol)	添加時間 (スタート後)	D-41 比率(%)		
			D	E	O
Ｌ-バリン	0.01	0 時	37	0	0.6
"	0.01	48	41	0	0.7
"	0.1	48	34	0	0.5
DＬ-バリン	0.01	48	35	0	0.5
イソ酪酸	0.005	0	33	7	0.6
"	0.005	48	35	0	0.6
２-ケトイソ酪酸	0.01	0	41	12	0.6
"	0.01	48	43	14	0.6
イソブタノール	0.01	48	33	0	0.6
Ｌ-バリン+	0.05	48	31	11	0.5
イソ酪酸	0.01				
無添加	—	—	17	4	0.2

実施例 2

実施例 1 に示した培養地を調製し、その 600 ml を 2000 ml エーレンマイヤーフラスコに分注

え、20 日のローヘキサンで抽出した。得られたローヘキサン層は蒸留で脱水後、40～45℃ 水浴中で減圧下濃縮すると 2.5 日のオイルが得られた。これを約 30 ml のローヘキサンにとかし、あらかじめ 2 ml のシリカゲルをローヘキサンでつめてあるカラムに装填せしめ、ローヘキサン：アセトン（85：5）で展開した。その結果目的物質 B-41 D を含有するフラクションを 2.5 日得た。これらを前述と同様の条件で濃縮すると B-41 D の粗結晶が得られた。これをローヘキサン：酢酸エチル（20：1）に溶解後、直ちに放置し、析出する結晶を採取し、B-41 D の粗結晶 210 mg を得た。

特許出願人 三 共 興 式 会 社
代 理 人 弁 理 士 橋 本 庄 治

し、減圧した。これを B-41、E、F、G、H、I、J、K、L、M、N、O、P、Q、R、S、T、U、V、W、X、Y、Z、AA、AB、AC、AD、AE、AF、AG、AH、AI、AJ、AK、AL、AM、AN、AO、AP、AQ、AR、AS、AT、AU、AV、AW、AX、AY、AZ、BA、BB、BC、BD、BE、BF、BG、BH、BI、BJ、BK、BL、BM、BN、BO、BP、BQ、BR、BS、BT、BU、BV、BW、BX、BY、BZ、CA、CB、CC、CD、CE、CF、CG、CH、CI、CJ、CK、CL、CM、CN、CO、CP、CQ、CR、CS、CT、CU、CV、CW、CX、CY、CZ、DA、DB、DC、DD、DE、DF、DG、DH、DI、DJ、DK、DL、DM、DN、DO、DP、DQ、DR、DS、DT、DU、DV、DW、DX、DY、DZ、EA、EB、EC、ED、EE、EF、EG、EH、EI、EJ、EK、EL、EM、EN、EO、EP、EQ、ER、ES、ET、EU、EV、EW、EX、EY、EZ、FA、FB、FC、FD、FE、FF、FG、FH、FI、FJ、FK、FL、FM、FN、FO、FP、FQ、FR、FS、FT、FU、FV、FW、FX、FY、FZ、GA、GB、GC、GD、GE、GF、GG、GH、GI、GJ、GK、GL、GM、GN、GO、GP、GQ、GR、GS、GT、GU、GV、GW、GX、GY、GZ、HA、HB、HC、HD、HE、HF、HG、HH、HI、HJ、HK、HL、HM、HN、HO、HP、HQ、HR、HS、HT、HU、HV、HW、HX、HY、HZ、IA、IB、IC、ID、IE、IF、IG、IH、II、IJ、IK、IL、IM、IN、IO、IP、IQ、IR、IS、IT、IU、IV、IW、IX、IY、IZ、JA、JB、JC、JD、JE、JF、JG、JH、JI、JJ、JK、JL、JM、JN、JO、JP、JQ、JR、JS、JT、JU、JV、JW、JX、JY、JZ、KA、KB、KC、KD、KE、KF、KG、KH、KI、KJ、KK、KL、KM、KN、KO、KP、KQ、KR、KS、KT、KU、KV、KW、KX、KY、KZ、LA、LB、LC、LD、LE、LF、LG、LH、LI、LJ、LK、LL、LM、LN、LO、LP、LQ、LR、LS、LT、LU、LV、LW、LX、LY、LZ、MA、MB、MC、MD、ME、MF、MG、MH、MI、MJ、MK、ML、MM、MN、MO、MP、MQ、MR、MS、MT、MU、MV、MW、MX、MY、MZ、NA、NB、NC、ND、NE、NF、NG、NH、NI、NJ、NK、NL、NM、NN、NO、NP、NQ、NR、NS、NT、NU、NV、NW、NX、NY、NZ、OA、OB、OC、OD、OE、OF、OG、OH、OI、OJ、OK、OL、OM、ON、OO、OP、OQ、OR、OS、OT、OU、OV、OW、OX、OY、OZ、PA、PB、PC、PD、PE、PF、PG、PH、PI、PJ、PK、PL、PM、PN、PO、PP、PQ、PR、PS、PT、PU、PV、PW、PX、PY、PZ、QA、QB、QC、QD、QE、QF、QG、QH、QI、QJ、QK、QL、QM、QN、QO、QP、QQ、QR、QS、QT、QU、QV、QW、QX、QY、QZ、RA、RB、RC、RD、RE、RF、RG、RH、RI、RJ、RK、RL、RM、RN、RO、RP、RQ、RR、RS、RT、RU、RV、RW、RX、RY、RZ、SA、SB、SC、SD、SE、SF、SG、SH、SI、SJ、SK、SL、SM、SN、SO、SP、SQ、SR、SS、ST、SU、SV、SW、SX、SY、SZ、TA、TB、TC、TD、TE、TF、TG、TH、TI、TJ、TK、TL、TM、TN、TO、TP、TQ、TR、TS、TT、TU、TV、TW、TX、TY、TZ、UA、UB、UC、UD、UE、UF、UG、UH、UI、UJ、UK、UL、UM、UN、UO、UP、UQ、UR、US、UT、UU、UV、UW、UX、UY、UZ、VA、VB、VC、VD、VE、VF、VG、VH、VI、VJ、VK、VL、VM、VN、VO、VP、VQ、VR、VS、VT、VU、VV、VW、VX、VY、VZ、WA、WB、WC、WD、WE、WF、WG、WH、WI、WJ、WK、WL、WM、WN、WO、WP、WQ、WR、WS、WT、WU、WV、WW、WX、WY、WZ、XA、XB、XC、XD、XE、XF、XG、XH、XI、XJ、XK、XL、XM、XN、XO、XP、XQ、XR、XS、XT、XU、XV、XW、XX、XY、XZ、YA、YB、YC、YD、YE、YF、YG、YH、YI、YJ、YK、YL、YM、YN、YO、YP、YQ、YR、YS、YT、YU、YV、YW、YX、YY、YZ、ZA、ZB、ZC、ZD、ZE、ZF、ZG、ZH、ZI、ZJ、ZK、ZL、ZM、ZN、ZO、ZP、ZQ、ZR、ZS、ZT、ZU、ZV、ZW、ZX、ZY、ZZ、AA、AB、AC、AD、AE、AF、AG、AH、AI、AJ、AK、AL、AM、AN、AO、AP、AQ、AR、AS、AT、AU、AV、AW、AX、AY、AZ、BA、BB、BC、BD、BE、BF、BG、BH、BI、BJ、BK、BL、BM、BN、BO、BP、BQ、BR、BS、BT、BU、BV、BW、BX、BY、BZ、CA、CB、CC、CD、CE、CF、CG、CH、CI、CJ、CK、CL、CM、CN、CO、CP、CQ、CR、CS、CT、CU、CV、CW、CX、CY、CZ、DA、DB、DC、DD、DE、DF、DG、DH、DI、DJ、DK、DL、DM、DN、DO、DP、DQ、DR、DS、DT、DU、DV、DW、DX、DY、DZ、EA、EB、EC、ED、EE、EF、EG、EH、EI、EJ、EK、EL、EM、EN、EO、EP、EQ、ER、ES、ET、EU、EV、EW、EX、EY、EZ、FA、FB、FC、FD、FE、FF、FG、FH、FI、FJ、FK、FL、FM、FN、FO、FP、FQ、FR、FS、FT、FU、FV、FW、FX、FY、FZ、GA、GB、GC、GD、GE、GF、GG、GH、GI、GJ、GK、GL、GM、GN、GO、GP、GQ、GR、GS、GT、GU、GV、GW、GX、GY、GZ、HA、HB、HC、HD、HE、HF、HG、HH、HI、HJ、HK、HL、HM、HN、HO、HP、HQ、HR、HS、HT、HU、HV、HW、HX、HY、HZ、IA、IB、IC、ID、IE、IF、IG、IH、II、IJ、IK、IL、IM、IN、IO、IP、IQ、IR、IS、IT、IU、IV、IW、IX、IY、IZ、JA、JB、JC、JD、JE、JF、JG、JH、JI、JJ、JK、JL、JM、JN、JO、JP、JQ、JR、JS、JT、JU、JV、JW、JX、JY、JZ、KA、KB、KC、KD、KE、KF、KG、KH、KI、KJ、KK、KL、KM、KN、KO、KP、KQ、KR、KS、KT、KU、KV、KW、KX、KY、KZ、LA、LB、LC、LD、LE、LF、LG、LH、LI、LJ、LK、LL、LM、LN、LO、LP、LQ、LR、LS、LT、LU、LV、LW、LX、LY、LZ、MA、MB、MC、MD、ME、MF、MG、MH、MI、MJ、MK、ML、MM、MN、MO、MP、MQ、MR、MS、MT、MU、MV、MW、MX、MY、MZ、NA、NB、NC、ND、NE、NF、NG、NH、NI、NJ、NK、NL、NM、NN、NO、NP、NQ、NR、NS、NT、NU、NV、NW、NX、NY、NZ、OA、OB、OC、OD、OE、OF、OG、OH、OI、OJ、OK、OL、OM、ON、OO、OP、OQ、OR、OS、OT、OU、OV、OW、OX、OY、OZ、PA、PB、PC、PD、PE、PF、PG、PH、PI、PJ、PK、PL、PM、PN、PO、PP、PQ、PR、PS、PT、PU、PV、PW、PX、PY、PZ、QA、QB、QC、QD、QE、QF、QG、QH、QI、QJ、QK、QL、QM、QN、QO、QP、QQ、QR、QS、QT、QU、QV、QW、QX、QY、QZ、RA、RB、RC、RD、RE、RF、RG、RH、RI、RJ、RK、RL、RM、RN、RO、RP、RQ、RR、RS、RT、RU、RV、RW、RX、RY、RZ、SA、SB、SC、SD、SE、SF、SG、SH、SI、SJ、SK、SL、SM、SN、SO、SP、SQ、SR、SS、ST、SU、SV、SW、SX、SY、SZ、TA、TB、TC、TD、TE、TF、TG、TH、TI、TJ、TK、TL、TM、TN、TO、TP、TQ、TR、TS、TT、TU、TV、TW、TX、TY、TZ、UA、UB、UC、UD、UE、UF、UG、UH、UI、UJ、UK、UL、UM、UN、UO、UP、UQ、UR、US、UT、UU、UV、UW、UX、UY、UZ、VA、VB、VC、VD、VE、VF、VG、VH、VI、VJ、VK、VL、VM、VN、VO、VP、VQ、VR、VS、VT、VU、VV、VW、VX、VY、VZ、WA、WB、WC、WD、WE、WF、WG、WH、WI、WJ、WK、WL、WM、WN、WO、WP、WQ、WR、WS、WT、WU、WV、WW、WX、WY、WZ、XA、XB、XC、XD、XE、XF、XG、XH、XI、XJ、XK、XL、XM、XN、XO、XP、XQ、XR、XS、XT、XU、XV、XW、XX、XY、XZ、YA、YB、YC、YD、YE、YF、YG、YH、YI、YJ、YK、YL、YM、YN、YO、YP、YQ、YR、YS、YT、YU、YV、YW、YX、YY、YZ、ZA、ZB、ZC、ZD、ZE、ZF、ZG、ZH、ZI、ZJ、ZK、ZL、ZM、ZN、ZO、ZP、ZQ、ZR、ZS、ZT、ZU、ZV、ZW、ZX、ZY、ZZ

手続補正書（自発）

昭和 57 年 11 月 15 日

特許庁長官 石 杉 和 夫 殿

1. 事件の表示

昭和 56 年特許願第 176061 号

2. 発明の名称

抗生物質 B-41 D、E 及び O の製造法

3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

住所 〒103 東京都中央区日本橋本町 3 丁目 1 番地の 6

名称 (185) 三共株式会社

代表者 取締役社長 阿 村 喜 典

4. 代 理 人

居 所 〒140 東京都品川区広町 1 丁目 2 番 58 号

三共株式会社内

電話 492-3131

氏 名 弁理士 (6007) 橋 本 庄 治

5. 補正により増加する発明の数 なし

6. 補正の対象 明証書の発明の詳細な説明の欄

7. 補正の内容 別紙の通り

4)
3金
こ
238
・フ
6、
コ
をび
ら、
いた。
と所
とし
を生
5の
った
とつ
8
と加
いた。
ハ
と加

1. 別添第1表3行目の「取り込み」を「取り込みを」と訂正する。
2. 同表1表2行目の「D-41」を「B-41」と訂正する。

以上

月15日

1 聖地の6

喜典

4号

庄治



PATENT BUREAU OF JAPAN,
OFFICIAL GAZETTE FOR UNEXAMINED PATENTS

Disclosure Number: 58-78594
Date of Disclosure: May 12, 1983
Application Number: 56-178061
Date of Filing: November 6, 1981
Inventors: Michihisa Ono
c/o Sankyo KK Fermentation Laboratories
1-2-58 Hiromachi, Shinagawa-ku, Tokyo
Hiroshi Takiguchi
Address as above
Hiroshi Mishima
Address as above
Michiya Terao
Address as above
Applicant: Sankyo KK
3-1-6 Nihonbashi Honcho, Chuo-ku, Tokyo

SPECIFICATION

1. Title of Invention

Method of Production of Antibiotics B-41D, E and G

2. Claims

(1) Method of production of antibiotics B-41D, E and G by culturing Streptomyces which is a producer of antibiotic B-41, adding one or more substance selected from a group which includes valine, isobutyric acid, isovaleric acid, 2-ketoisovaleric acid, isocaproic acid, salt or ester of any of the foregoing, isobutanol and its ester to the culture medium.

(2) Method according to Claim (1) in which the organism which produces B-41 is Streptomyces sp. B-41-146.

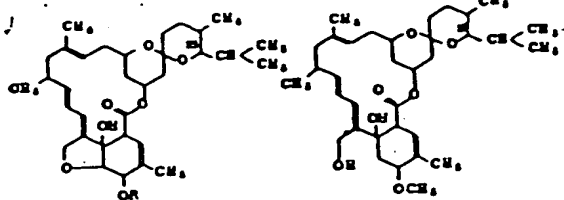
(3) Method according to Claim (2) in which the objective is the production of B-41D.

(4) Method according to Claim (1) in which B-41D is produced by culturing Streptomyces sp. B-41-146 in a medium to which one or more substance selected from a group which includes L- or DL-valine, isobutyric acid, 2-ketovaleric acid and the salt or ester of any of the foregoing is added.

3. Detailed Description of the Invention

This invention concerns a method by which antibiotics B-41D, E and G which are effective as insecticides and acaricides are produced efficiently on industrial scale.

B-41D, E and G are antibiotics produced by culturing Streptomyces species which is a producer of B-41, for example strain B-41-146. The structural formulae are as follows.



B-41 D: R-H

B-41 E

B-41 G: R-CH₃

The efficacy of these agents against animal parasites, especially nematodes, and against mites which parasitize plants and animals has been described in Kokai 56-32481 and in Japanese Patent Applications 55-153141 and 56-7091.

The problem is that when organisms which produce B-41 are cultured in the conventional manner, B-41 A₁, A₃ and B₂ which have a methyl at position 25 and B-41 A₄, B₃ and B₂ which have an ethyl in that position are also produced. There is therefore a demand for a method which would produce higher yields of D, E and G which have an isopropyl in position 25.

We discovered that by adding certain substances to the culture medium for B-41-producing organisms, B-41 D, E and G are obtained in high yields.

This invention concerns a method of production of B-41 D, E and G by adding to the culture of B-41-producing *Streptomyces* one or more substance selected from a group comprised of valine, isobutyric acid, isovaleric acid, 2-ketoisovaleric acid, isocaproic acid, salt or ester of the above, isobutanol and its ester.

B-41-producing strains such as *Streptomyces* B-41-146 are registered as FERM 1438 at the Agency of Industrial Science and Technology, MITI. The microbiological properties of the strain are given in detail in Kokai 50-29472. The organisms which are used in this invention were obtained by modifying strain B-41-146 by methods such as irradiation with X-ray, UV and radioactive rays or by means of mutagens, and include producers of B-41 D, E and G.

Valine used in our method may be the L isomer or the DL form. Among valine, isobutyric acid, isovaleric acid, 2-ketoisovaleric acid and isocaproic acid, L or DL valine, isobutyric acid and 2-ketoisovaleric acid are especially suitable. Their salts may be those of sodium or potassium. Their esters may be methyl, ethyl, or n-butyl which are lower alkyl esters, or benzyl ester. Isobutanol and its ester may also be used. Examples of the latter are esters of lower saturated aliphatic acids such as acetic and propionic acids. In experiments using ¹³C-labeled compounds, it was found that isopropyl group was specifically incorporated at position 25.

The amount of additive in the culture medium should be in the range of 0.001-1 w/v%, preferably 0.005-0.01 w/v%. Addition may be made at the time of preparation of the medium or during culture at any suitable step.

The culture medium may be any preparation which provides the necessary nutrients to the organism aside from the specific additives. The carbon source may be glucose, sucrose, starch, glycerin, millet jelly, molasses or soybean oil. The

nitrogen source may be skimmed milk, soybean powder, wheat germ, meat extract, peptone, yeast cells, corn steep liquor, ammonium sulfate or ammonium nitrate. Calcium carbonate, sodium chloride, potassium chloride and phosphate may also be added as required.

The method of culture, like that used for most antibiotic-producing organisms, should be one which uses a liquid medium, especially deep culture. The conditions include aerobic environment at 22-30°C, usually around 28°C. The pH of the medium should be in the range of 5.5-8.0, preferably near neutrality at 6.5-7.5. Culture is continued until maximum concentrations of B-41 D, E and G are attained. The time required to reach this stage varies with the method of culture, temperature, and composition of the medium, but is usually 5-15 days.

For detection of B-41 components, the following procedure is used. Three ml of the culture is placed in a small test tube, 7 ml acetone is added, and the preparation is shaken to extract the desired material and is then centrifuged. Ten to 20 μ l of the supernatant is allowed to adsorb to TLC plate (made by Merck & Co., Kieselgel 60 F254) and developed with a mixture of dioxane:carbon tetrachloride (18:82) for 4 hours, after which absorption at 245 nm (blank: 380 nm) is measured using a 2-wavelength chromato-scanner. Absorption is compared with that of the model compound and the yield is calculated.

To collect the antibiotics from the culture, adsorbents such as activated carbon, alumina or silicagel, synthetic adsorbent such as Dia-ion HP-10 or HP-20 (made by Mitsubishi Chemicals), fixer such as Avicel (made by Asahi Chemicals) or filter paper, ion exchange resin or filtration agent such as ion exchange gel may also be used. The harvesting method described below is the most effective.

Culture is filtered with the aid of filtration helper such as diatomaceous earth, and the cake is extracted with methanol. Water is added to the extract and the preparation is extracted with n-hexane and concentrated under reduced pressure to obtain an oily material containing the desired substance. This material is adsorbed with silicagel (Kakogel C-200) and eluted with a mixture of n-hexane:acetone (95:5) to obtain fractions containing D, E and G. Each fraction is concentrated under reduced pressure, and the residue is dissolved in a small volume of a mixture of n-hexane:ethyl acetate (20:1) and allowed to stand at room temperature, B-41 D, B-41 E and B-41 G are obtained each in its crystalline form.

With the procedure of our invention, the yields of D, E and G are excellent and the total yield is high, so that separation and purification are made easy. The procedure would be highly useful in industry.

The invention is described in detail in the examples which follow.

Example 1

Stock culture medium (sucrose 1%, polypeptone 0.35%, K_2HPO_4 0.05%) was placed in 500 ml Erlenmeyer flasks, 100 ml per flask and sterilized. One loopful of strain B 41-146 was inoculated into each flask and incubated at 28°C for 48 hours to obtain stock cultures.

One ml of the stock culture was inoculated into a 100 ml Erlenmeyer flask containing 20 ml of the basic medium (glucose 4%, soybean powder 1%, skimmed milk 1%, NaCl 0.3%, corn steep liquor 0.2% and $CaCO_3$ 0.05%) and shake-cultured at 28°C for 3 days. DL-valine-2- ^{13}C was added at 0.01 w/v% and culture was continued for 2 more days, at the end of which time the proportion of D in the B-41 antibiotics was about 65%, that of E, 18% and that of G, 5%. When the additive was not used, the proportions of D, E and G were 37%, 9% and 2%, respectively.

The culture obtained with the addition of DL-valine was filtered and the cells were extracted with methanol. Water was added to obtain a 50% solution which was then extracted with n-hexane. The n-hexane layer was dehydrated with Glauber's salt and concentrated under reduced pressure to obtain an oily substance. This material was purified by means of silicagel column and the Merck rover column and each component was isolated. Incorporation of ^{13}C was determined by 400 MHz ^{13}C -NMR and MS. It was found that ^{15}C of DL-valine-2 was specifically incorporated at position 25 of D, E and G.

Example 2

One ml of stock culture was transferred to 20 ml of medium composed of glucose 6%, asparagine 0.3%, leucine 0.5%, dipotassium phosphate 0.05%, magnesium sulfate 0.05%, sodium chloride 0.05%, calcium chloride 0.02%, zinc sulfate 0.005%, manganese sulfate 0.001%, ferrous sulfate 0.002% and trace amounts of vitamins. L-valine, isobutyric acid, 2-ketoisovaleric acid, isocaproic acid and isobutanol were added under the conditions indicated in Table 1. After shake-culturing at 28°C for 8 days, the results shown in the table were obtained.

Example 3

Six hundred ml of stock culture was placed in a 2000 ml Erlenmeyer flask and sterilized. One loopful of culture of strain B-41-146 was inoculated and cultured for 48 hours at 28°C. The contents of two such Erlenmeyer flasks were transferred to a 30-liter jar fermentor which contained 20 liters of sterilized medium of pH 7.2-7.5, containing glucose 4%, soybean powder 1%, cornstarch 0.5%, skimmed milk 1%, corn steep liquor 0.2%, sodium chloride 0.3% and $CaCO_3$ 0.05%. During the culture, the temperature was maintained at 28°C and the internal pressure at 0.5 kg/cm². After 3 days of culture, 0.01% DL-valine was added and culture was continued for 5 more days. Of the total B-41 antibiotics, D constituted 68% (by weight). When

Table 1

Additive	Conc. (w/v%)	Time of addition*	% of total B-41		
			D	E	G
L-valine	0.01	0 hr	37	0	0.1
"	0.01	4.8	41	3	0.7
"	0.1	4.8	34	0	0.5
DL-valine	0.01	4.8	36	3	0.5
Isobutyric acid	0.005	0	33	7	0.6
"	0.005	4.8	35	3	0.6
2-Ketoisovaleric acid	0.01	0	41	12	0.6
"	0.01	4.8	43	14	0.9
Isobutanol	0.01	4.8	33	0	0.6
L-valine + Isobutyric acid	0.05 0.01	4.8	31	11	0.5
None	—	—	17	4	0.2

* Hours after the start of culture

culture was maintained without the additive, the proportion of D was only 35%. When 20 liters of culture obtained with the addition of DL-valine was adjusted to pH 3 with sulfuric acid and the culture was filtered under pressure with the addition of 1 kg celite, a cake of about 3 kg was obtained. This was extracted with 15 liters of methanol and filtered. To 15 liters of the methanol solution, 10 liters of water was added and the preparation was extracted with 20 liters of n-hexane. The n-hexane layer was dehydrated with Glauber's salt and concentrated under reduced pressure at 40-45°C in a water bath, 23 g of oil was obtained. This was dissolved in about 30 ml n-hexane and adsorbed on a column containing 2 kg silicagel and n-hexane. Development was done with n-hexane:acetone at 95:5, to obtain 2.5 liters of fraction containing B-41 D. This was concentrated in the manner described above to obtain crude crystals of B-41 D. These were dissolved in n-hexane:ethyl acetate at 20:1 and allowed to stand at room temperature. The crystals which formed were filtered to obtain 210 mg of purified crystals of B-41 D.